

Process for detecting evanescently excited luminescence

Patent number: DE69526438T
Publication date: 2002-10-31
Inventor: DUVENECK L (DE); NEUSCHAEFER DIETER (CH); EHRAT MARKUS (CH)
Applicant: NOVARTIS AG (CH)
Classification:
- international: **G01N21/77; G01N21/77; (IPC1-7): G01N21/77; G01N21/64**
- european: **G01N21/77B**
Application number: DE19956026438T 19950517
Priority number(s): CH19940001643 19940527; WO1995EP01845 19950517

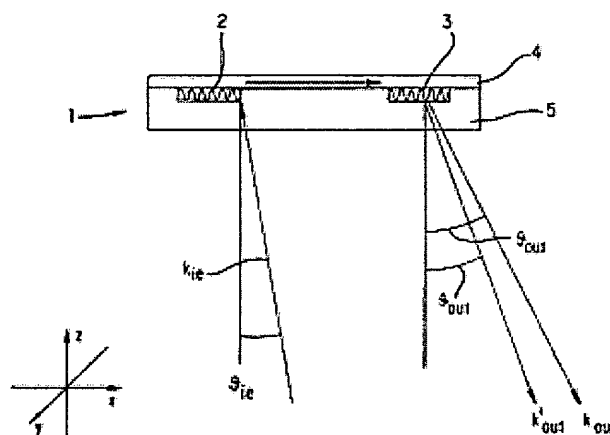
Also published as:

WO9533198 (A1)
WO9533197 (A1)
EP0760944 (A1)
EP0759159 (A1)
US5959292 (A1)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE69526438T
Abstract of corresponding document: **US5822472**
PCT No. PCT/IB95/00368 Sec. 371 Date Mar. 4, 1997 Sec. 102(e) Date Mar. 4, 1997 PCT Filed May 17, 1995 PCT Pub. No. WO95/33198 PCT Pub. Date Dec. 7, 1995 The invention relates to a process for determining luminescence with a planar dielectric optical sensor platform which consists of a transparent substrate to which a thin transparent waveguiding layer is applied, which sensor platform is provided with a coupling grating for the input-coupling of the excitation light and the refractive index of the substrate is lower than the refractive index of the waveguiding layer, by bringing a liquid sample as superstrate into contact with the layer, and measuring the luminescence produced by substances having luminescence properties in the sample, or by substances having luminescence properties immobilized on the layer, optoelectronically. The invention also relates to the use of the process in quantitative affinity sensing and to the use thereof for the quantitative determination of luminescent constituents in optically turbid solutions, and to sensor platform for carrying out the process.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

⑨⑦ **EP 0 760 944 B 1**

⑩ **DE 695 26 438 T 2**

⑥① Int. Cl.⁷:
G 01 N 21/77
G 01 N 21/64

②①	Deutsches Aktenzeichen:	695 26 438.9
⑥⑥	PCT-Aktenzeichen:	PCT/EP95/01845
⑥⑥	Europäisches Aktenzeichen:	95 922 453.6
⑥⑦	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 95/33197
⑥⑥	PCT-Anmeldetag:	17. 5. 1995
⑥⑦	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	7. 12. 1995
⑥⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	12. 3. 1997
⑥⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	17. 4. 2002
④⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	31. 10. 2002

③⑩ Unionspriorität:
164394 27. 05. 1994 CH

⑦③ Patentinhaber:
Novartis AG, Basel, CH

⑦④ Vertreter:
Spott & Weinmiller, 80336 München

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,
NL, PT, SE

⑦② Erfinder:
DUVENECK, L., Gert, D-79189 Bad Krozingen, DE;
NEUSCHÄFER, Dieter, CH-4132 Muttenz, CH;
EHRAT, Markus, CH-4312 Magden, CH

⑥④ **VERFAHREN ZUM NACHWEIS ABKLINGEND ANGEREGTER LUMINESZENZ**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 695 26 438 T 2

DE 695 26 438 T 2

29.08.02

-1-

95 922 453.6

EP 0 760 944 B1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung einer mit einer planaren, dielektrischen optischen Sensorplattform auf der Basis eines Wellenleiters evaneszent angeregten Lumineszenz. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Verfahrens in der quantitativen Affinitätssensorik sowie die Verwendung zur selektiven quantitativen Bestimmung lumineszierender Bestandteile in optisch trüben Lösungen.

Koppelt man eine Lichtwelle in einen planaren Wellenleiter, der von optisch dünneren Medien umgeben ist, so wird sie durch Totalreflektion an den Grenzflächen der wellenleitenden Schicht geführt. Ein planarer Wellenleiter besteht im einfachsten Fall aus einem Dreischichtsystem: Substrat, wellenleitende Schicht, Superstrat (bzw. zu untersuchende Probe), wobei die wellenleitende Schicht den höchsten Brechungsindex besitzt. Zusätzliche Zwischenschichten können die Wirkung des planaren Wellenleiters noch verbessern.

In die optisch dünneren Medien tritt dabei ein Bruchteil der Lichtenergie ein. Diesen Anteil bezeichnet man als evaneszentes (=abnehmendes) Feld. Die Stärke des evaneszenten Feldes ist sehr stark abhängig von der Dicke der wellenleitenden Schicht selbst sowie vom Verhältnis der Brechungsindices der wellenleitenden Schicht und der sie umgebenden Medien. Bei dünnen Wellenleitern, d. h. Schichtdicken von derselben oder niedrigerer Dicke als der zu führenden Wellenlänge, können diskrete Moden des geleiteten Lichts unterschieden werden. Mit einem evaneszenten Feld ist es zum Beispiel möglich, Lumineszenz in optisch dünneren Medien anzuregen, und zwar nur in unmittelbarer Umgebung zur geleiteten Lichtwelle. Dieses Prinzip wird evaneszente Lumineszenzanregung genannt.

Für die Analytik ist die evaneszente Lumineszenzanregung von großem Interesse, da die Anregung auf die direkte Umgebung der wellenleitenden Schicht beschränkt ist.

Verfahren und Apparate zur Bestimmung der evaneszent angeregten Lumineszenz von mit Lumineszenzfarbstoffen markierten Antikörpern oder Antigenen sind bekannt und zum Beispiel in der US-A-4 582 809 beschrieben. Die dort beanspruchte Anordnung verwendet eine Faseroptik zur evaneszenten Lumineszenzanregung. Solche Faseroptiken haben typischerweise einen Durchmesser von bis zu einem Millimeter und leiten eine Vielzahl von Moden, wenn Laserlicht in sie eingekoppelt wird. Die evaneszent angeregte Lumineszenz kann in einfacher Weise nur durch den in die Faser rückgekoppelten Anteil gemessen werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass der apparative Aufbau relativ groß ist und vergleichsweise große Probenvolumina benötigt werden. Die Anordnung lässt sich kaum wesentlich weiter verkleinern oder gar zu integrierten optischen Sensoren miniaturisieren.

Eine Erhöhung der Empfindlichkeit ist im allgemeinen mit einer Vergrößerung der Anordnung verbunden.

Photometrische Instrumente zur Bestimmung der Lumineszenz von Biosensoren unter evaneszenten Anregungsbedingungen mit planaren optischen Wellenleitern sind ebenfalls bekannt und zum Beispiel in der WO 90/06503 beschrieben. Die dort verwendeten wellenleitenden Schichten sind 160 nm bis 1000 nm dick, die Einkopplung der Anregungswelle erfolgt ohne Gitterkoppler.

Es sind verschiedene Versuche unternommen worden, die Empfindlichkeit evaneszent angeregter Lumineszenz zu steigern und integrierte optische Sensoren herzustellen. So wird zum Beispiel in Biosensors & Bioelectronics 6 (1991), 595-607 über planare mono-

oder nieder-modale Wellenleiter berichtet, die in einem zweistufigen Ionenaustauschverfahren hergestellt werden, und bei denen die Einkopplung der Anregungswelle mit Prismen erfolgt. Als Affinitätssystem wird humanes Immunglobulin G / fluoresceinmarkiertes Protein A verwendet, wobei der Antikörper auf dem Wellenleiter immobilisiert und das nachzuweisende fluoresceinmarkierte Protein A in Phosphatpuffer einem Film aus Polyvinylalkohol zugesetzt wird, mit dem die Messregion des Wellenleiters überzogen wird. Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass nur geringe Brechungsindexunterschiede zwischen wellenleitender Schicht und Substratschicht erreichbar sind, was eine verhältnismäßig geringe Empfindlichkeit zur Folge hat.

Die Empfindlichkeit wird mit 20 nm an Protein A gebundenem Fluoresceinisothiocyanat angegeben. Um geringste Spuren bestimmen zu können, ist dies noch unbefriedigend und daher eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit notwendig. Darüberhinaus erscheint die Reproduzierbarkeit und praktische Durchführbarkeit der Lichteinkopplung durch Prismen aufgrund der großen Abhängigkeit der Einkoppeleffizienz von Qualität und Größe der Kontaktfläche zwischen Prisma und Wellenleiter schwierig.

In der US-A-5 081 012 wird ein anderes Prinzip vorgeschlagen. Die planare wellenleitende Schicht ist 200 nm bis 1000 nm dick und enthält zwei Gitter, von denen eines als Reflexionsgitter ausgebildet ist, so dass die eingekoppelte Lichtwelle den zwischen den Gittern liegenden Sensorbereich mindestens zweimal durchlaufen muss. Auf diese Weise soll eine erhöhte Empfindlichkeit erreicht werden. Ein Nachteil ist, dass die reflektierte Strahlung zu einer unerwünschten Erhöhung der Untergrund-Strahlungsintensität führen kann.

29.05.02

-4-

Die Herstellung planarer Wellenleiter ist ein Vorgang, bei dem es sehr wesentlich auf die Planarität des Trägermaterials, die konstante Dicke und Homogenität der wellenleitenden Schicht und den Brechungsindex des dafür verwendeten Materials ankommt. Dies ist zum Beispiel in der EP-A-0 533 074 beschrieben, und es wird dort vorgeschlagen, anorganische Wellenleiter auf Kunststoffträgermaterialien aufzubringen. Dies bietet den Vorteil, dass zum Beispiel eine wirtschaftlich günstige Strukturierung des Gitterkopplers durch Einprägen der Struktur in den Kunststoff durchgeführt werden kann. Andererseits werden aber auch hohe Anforderungen an die optische Qualität der Kunststoffträgermaterialien gestellt.

WO 91/10122 beschreibt ein Spektrophotometer für die Messung von Absorptionsänderungen von Strahlung, die durch das evanescente Feld mit einem Analyt in Wechselwirkung tritt, das eine Wellenleitung mit zwei Gittern zum Ein- und Auskoppeln von Strahlungslicht verwendet.

Planare Wellenleiter bieten gegenüber Wellenleitern, die auf Faseroptiken basieren wesentliche Vorteile in der großtechnischen Herstellung. Insbesondere ist es in der Regel erforderlich, bei Fasern die geschnittenen Enden nachzupolieren, damit eine einwandfreie optische Qualität erzielt wird. Planare Wellenleiter hingegen können großflächig hergestellt und danach in der gewünschten Größe ausgestanzt, gebrochen oder geschnitten werden. Ein Nacharbeiten der Kanten erübrigt sich in den meisten Fällen, wodurch die Massenherstellung wirtschaftlicher wird.

Weitere Vorteile von planaren Wellenleitern mit Gitterkopplern sind die einfache Justierung im Messgerät oder in der Messanordnung sowie das einfache Aufbringen einer Beschichtung, beispielsweise zur Immobilisierung eines Analyten. Hierfür können

29.05.02

-5-

Standardverfahren aus der Beschichtungstechnologie, mit denen sich reproduzierbare, konstante Schichtdicken herstellen lassen, verwendet werden. Beispiele sind Sprühen, Rakeln, Schleuderbeschichten oder Tauchen. Die Qualitätskontrolle lässt sich ebenfalls mit bekannten und sehr präzisen Methoden einfach durchführen. Geeignet sind beispielsweise mikroskopische oder interferometrische Methoden, Ellipsometrie oder Kontaktwinkelmessungen. Diese Verfahren sind für gekrümmte Oberflächen, wie sie bei Wellenleitern, die auf Faseroptiken basieren, nicht oder nur schwierig einsetzbar.

Neben der eigentlichen wellenleitenden Schicht stellt die Art der Einkopplung der Lichtwelle in die wellenleitende Schicht ein Hauptproblem dar. Die Anforderungen an Gitter zur Einkopplung von Licht in sich verjüngende Wellenleiter für integrierte optische Sensoren werden zum Beispiel in Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors V, Proc. SPIE, Vol 2068, 1-13, 1994 dargestellt. Dabei werden die Modulationstiefe des Gitters und die Schichtdicke des Wellenleiters als kritische Merkmale beschrieben. Die dort vorgeschlagenen Systeme können zum Beispiel als integrierte optische Lichtzeiger Verwendung finden, wobei jedoch keine Hinweise auf eine zu detektierende Lumineszenz gegeben werden.

Sollen derartige planare Wellenleiter mit integrierten Gitterkopplern für Lumineszenzmessungen verwendet werden, so sind die wesentlichen Merkmale für ihre Brauchbarkeit und zur Erreichung einer hohen Empfindlichkeit eine ausreichend große Einkoppleffizienz, ein möglichst starkes evaneszentes Feld und eine geringe Dämpfung der geführten Welle. Diese Merkmale werden kritisch bestimmt durch die Kombination von Brechungsindex der wellenleitenden Schicht und des Trägermaterials und eventuell vorhandener Zwischenschichten, Schichtdicke des Wellenleiters,

29.05.02

- 6 -

Struktur, Modulationstiefe und Gitterperiode des Gitterkopplers. Hinzu kommt die erforderliche optische Qualität der Flächen, deren Planarität beziehungsweise Rauigkeit.

Es wurde nun gefunden, dass sich auf einfache Art, ohne ein zusätzliches Reflexionsgitter zu verwenden, ein Verfahren zur evaneszenten Anregung und Detektion von Lumineszenz mit hoher Empfindlichkeit durchführen lässt, wenn die erwähnten kritischen Merkmale wie Brechungsindex, Schichtdicke und Modulationstiefe erfindungsgemäß kombiniert werden. Typischerweise beträgt dann die Dämpfung der geleiteten Lichtwelle weniger als 3dB/cm, was eine lange Wegstrecke des geleiteten Strahls und eine geringe Streuung der geführten Welle in die sie umgebenden Medien zur Folge hat. Insbesondere werden unter diesen Bedingungen bevorzugt der TE₀ und der TM₀ Mode geführt. Die Leitungsstrecke reicht aus, um zusätzlich zur Lumineszenz die Absorption des Anregungslichtes in Anwesenheit einer absorbierenden Probe mit hoher Genauigkeit messen zu können.

Diese planaren Wellenleiter, in denen nur ein oder wenige Moden geführt werden zeichnen sich durch eine besonders hohe Empfindlichkeit bei kleinstmöglicher Bauweise aus. In der Regel wird diese Empfindlichkeit von vielmodigen Wellenleitern planarer oder faserartiger Bauart nicht erreicht, oder wenn sie erreicht wird, so ist dies nur mit erheblich größeren geometrischen Abmessungen möglich.

Die Einkoppeleffizienz des Koppelgitters ist hoch, so dass die Intensität der eingekoppelten Lichtwelle ebenfalls groß ist, was in Verbindung mit der geringen Dämpfung zu einer bereits guten Empfindlichkeit führt.

29.05.02

-7-

Die Empfindlichkeit wird noch dadurch gesteigert, dass das evaneszente Feld überraschend stark ist und die dadurch erzeugten hohen elektromagnetischen Feldstärken zu einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit beitragen. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, auch geringste Mengen lumineszierenden Materials an der Oberfläche der wellenleitenden Schicht zu bestimmen.

Dementsprechend bezieht sich die Erfindung gemäß einem ihrer Aspekte auf ein Verfahren zur Bestimmung einer Lumineszenz mit einer planaren, dielektrischen optischen Sensorplattform, die aus einem transparenten Trägermaterial (a) besteht, auf das eine dünne, transparente wellenleitende Schicht (b) aus einem anorganischen Material aufgebracht ist, wobei die Sensorplattform mit einem Gitter zur Einkopplung des Anregungslichts versehen ist und der Brechungsindex des Trägermaterials (a) kleiner ist als der Brechungsindex der wellenleitenden Schicht (b), bei dem eine flüssige Probe mit der Schicht (b) in Kontakt gebracht wird, und die von lumineszenzfähigen Stoffen in der Probe oder von auf der Schicht (b) immobilisierten lumineszenzfähigen Stoffen erzeugte Lumineszenz optoelektronisch gemessen wird, dadurch gekennzeichnet, dass man

- (A) das Anregungslaserlicht durch das Gitter einkoppelt, es die wellenleitende Schicht durchlaufen lässt und hierbei die lumineszenzfähigen Stoffe im evaneszenten Feld der wellenleitenden Schicht zur Lumineszenz anregt,
- (B) das Gitter eine Modulationstiefe von 3 bis 60 nm aufweist,
- (C) die Dicke der Schicht (b) 40 bis 160 nm beträgt, und
- (D) das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der Schicht (b) kleiner als 0,5 ist.

Planare, dielektrische optische Sensorplattform bedeutet im Rahmen dieser Erfindung, dass sie in Form eines Streifens, einer Platte, einer runden Scheibe oder einer beliebigen anderen geo-

29.05.02

-8-

metrischen Form ausgebildet sein kann, sofern diese mit bloßem Auge als planar angesehen wird. Die gewählte geometrische Form ist an und für sich unkritisch und kann sich nach dem Aufbau des gesamten Gerätes richten, in dem die Sensorplattform eingebaut ist. Sie kann aber auch als selbständiges Element, räumlich separiert von der Anregungslichtquelle und vom optoelektronischen Nachweissystem, eingesetzt werden. Bevorzugt sind Anordnungen, die eine weitgehende Miniaturisierung zulassen.

Als Trägermaterial kommen zum Beispiel Gläser aller Art oder Quarz in Frage. Vorzugsweise werden Gläser verwendet, die einen möglichst niedrigen optischen Brechungsindex und möglichst geringe Eigenlumineszenz aufweisen, und die eine möglichst einfache optische Bearbeitung, wie Ätzen, Schleifen und Polieren zulassen. Das Trägermaterial muss mindestens bei der Anregungs- und Emissionswellenlänge transparent sein.

Als Trägermaterialien können auch Kunststoffe verwendet werden, wie sie zum Beispiel in der EP-A-0 533 074 beschrieben sind.

Die Trägermaterialien können noch mit einer dünnen Schicht überzogen sein, die einen Brechungsindex kleiner oder gleich dem Trägermaterial aufweist und die nicht dicker als 0,01 mm ist. Diese Schicht kann zur Verminderung der Oberflächenrauigkeit des Trägermaterials dienen und kann aus einem thermoplastischen, einem thermisch vernetzbaren oder einem strukturvernetzten Kunststoff oder auch aus anorganischen Materialien wie SiO_2 bestehen.

Zur Lumineszenzanregung kommt nur weitgehend paralleles Licht in Frage. Unter weitgehend parallel ist im Rahmen dieser Erfindung eine Divergenz von weniger als 5° zu verstehen. Das heißt, das Licht kann schwach divergent oder schwach konvergent sein.

Bevorzugt verwendet man für die Lumineszenzanregung kohärentes Licht, besonders bevorzugt Laserlicht einer Wellenlänge von 300 bis 1100 nm, ganz besonders bevorzugt von 450 bis 850 nm und insbesondere von 480 bis 700 nm.

Als Laser können zum Beispiel Farbstofflaser, Gaslaser, Festkörperlaser und Halbleiterlaser eingesetzt werden. Bei Bedarf kann die Emissionswellenlänge durch nichtlineare Kristalloptiken auch verdoppelt werden. Der Strahl kann auch durch optische Elemente noch weiter fokussiert, polarisiert oder durch Graufilter abgeschwächt werden. Besonders geeignete Laser sind Argon-Ionen Laser und Helium-Neon Laser, die bei Wellenlängen zwischen 457 nm und 514 nm beziehungsweise zwischen 543 nm und 633 nm emittieren. Ganz besonders geeignet sind Diodenlaser oder frequenzverdoppelte Diodenlaser aus Halbleitermaterial, die bei einer Fundamentalwellenlänge zwischen 630 nm und 1100 nm emittieren, da sie wegen ihrer kleinen Abmessungen und geringen Leistungsaufnahme eine weitgehende Miniaturisierung des ganzen Sensorsystems erlauben.

Unter Probe wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die gesamte zu untersuchende Lösung verstanden, die eine nachzuweisende Substanz - den Analyt - enthalten kann. Der Nachweis kann in einem ein-oder mehrstufigen Assay erfolgen, in dessen Verlauf die Oberfläche der Sensorplattform mit einer oder mehreren Lösungen kontaktiert wird. Dabei enthält mindestens eine der verwendeten Lösungen einen lumineszenzfähigen Stoff, der erfindungsgemäß detektiert werden kann.

Wenn ein lumineszenzfähiger Stoff bereits an der wellenleitenden Schicht (b) adsorbiert ist, kann die Probe auch frei von lumineszierenden Bestandteilen sein. Die Probe kann weitere Bestandteile enthalten, wie zum Beispiel pH-Puffer, Salze, Säuren, Ba-

sen, oberflächenaktive Stoffe, viskositätsbeeinflussende Zusätze oder Farbstoffe. Insbesondere kann eine physiologische Kochsalzlösung als Lösungsmittel verwendet werden. Wenn der lumineszenzfähige Teil selbst flüssig ist, so kann auf die Zugabe eines Lösungsmittels verzichtet werden. In diesem Fall kann die Probe bis zu 100% lumineszenzfähigen Anteil enthalten.

Weiterhin kann die Probe ein biologisches Medium, wie zum Beispiel Eigelb, eine Körperflüssigkeit oder deren Bestandteile, insbesondere Blut, Serum, Plasma oder Urin sein. Darüberhinaus kann es sich um Oberflächenwasser, Lösungen von Extrakten aus natürlichen oder synthetischen Medien wie Böden oder Pflanzenteilen, Bioprozessbrühen oder Synthesebrühen handeln.

Die Probe kann entweder unverdünnt oder zusätzlich mit einem Lösungsmittel verwendet werden.

Als Lösungsmittel kommen Wasser, wässrige Puffer- und Proteinlösungen sowie organische Lösungsmittel in Frage. Als organische Lösungsmittel eignen sich Alkohole, Ketone, Ester, und aliphatische Kohlenwasserstoffe. Bevorzugt werden Wasser, wässrige Puffer oder ein Gemisch von Wasser mit einem mischbaren organischen Lösungsmittel verwendet.

Die Probe kann aber auch im Lösungsmittel nicht lösliche Bestandteile enthalten, wie Pigmentteilchen, Dispergatoren, natürliche und synthetische Oligomere oder Polymere. Sie liegt dann als optisch trübe Dispersion oder Emulsion vor.

Geeignete lumineszierende Verbindungen sind Lumineszenzfarbstoffe mit einer Lumineszenz im Wellenlängenbereich von 330 nm bis 1000 nm, wie Rhodamine, Fluoresceinderivate, Cumarinderivate, Distyrylbiphenyle, Stilbenderivate, Phthalocyanine, Naph-

thalocyanine, Polypyridyl- Rutheniumkomplexe, wie z. B. Tris(2,2'- bipyridyl)rutheniumchlorid, Tris(1,10- phenanthro- lin)rutheniumchlorid, Tris(4,7-diphenyl-1,10- phenanthro- lin)rutheniumchlorid und Polypyridyl-Phenazin- Rutheniumkom- plexe, Platin-Porphyrin-Komplexe, wie z. B. Octaethyl-Platin- Porphyrin, langlebige Europium- und Terbiumkomplexe oder Cyanin- Farbstoffe. Besonders geeignet für Analysen in Blut oder Serum sind Farbstoffe mit Absorptions- und Emissionswellenlängen im Bereich 600 - 900 nm.

Ganz besonders geeignet sind Farbstoffe wie beispielsweise Fluoresceinderivate, die funktionelle Gruppen enthalten, mit denen sie kovalent gebunden werden können wie zum Beispiel Fluoresceinisothiocyanat.

Ebenfalls gut geeignet sind die von der Fa. Biological Detection Systems Inc. im Handel befindlichen funktionellen Fluoreszenz- farbstoffe, beispielsweise die mono- und bifunktionellen Cy5.5™ Farbstoffe, die zum Beispiel auch in Clinical Chemistry 40 (9) : 1819-1822, 1994 beschrieben sind.

Bevorzugte Lumineszenz ist die Fluoreszenz.

Die zur Anwendung kommenden Lumineszenzfarbstoffe können auch chemisch an Polymere oder an einen der Bindungspartner in bio- chemischen Affinitätssystemen, z. B. Antikörper oder Antikörper- fragmente, Antigene, Proteine, Peptide, Rezeptoren oder ihre Li- ganden, Hormone oder Hormonrezeptoren, Oligonukleotide, DNA- Stränge und RNA-Stränge, DNA- oder RNA- Analoga, Bindungspro- teine wie Protein A und G, Avidin oder Biotin, Enzyme, Enzymco- faktoren oder Inhibitoren, Lektine oder Kohlenhydrate, gebunden sein. Die zuletzt genannte kovalente Lumineszenzmarkierung ist für reversible oder irreversible (bio)chemische Affinitätsassays

die bevorzugte Verwendung. Weiterhin können auch lumineszenzmarkierte Steroide, Lipide und Chelatoren zum Einsatz kommen. Speziell für Hybridisierungsassays mit DNA-Strängen oder Oligonukleotiden sind auch interkalierende Lumineszenzfarbstoffe besonders geeignet, insbesondere wenn sie - wie verschiedene Rutheniumkomplexe - bei der Interkalation eine Lumineszenzverstärkung aufweisen. Werden diese lumineszenzmarkierten Verbindungen mit ihren auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisierten Affinitätspartnern in Kontakt gebracht, so lässt sich ihre Bindung leicht anhand der gemessenen Lumineszenzintensität quantitativ bestimmen. Ebenso ist eine quantitative Bestimmung des Analyten durch Messung der Lumineszenzänderung bei Wechselwirkung der Probe mit den Luminophoren möglich, z. B. in Form von Lumineszenzlöschung durch Sauerstoff oder von Lumineszenzverstärkung durch Konformationsänderungen von Proteinen.

Der Brechungsindex der wellenleitenden Schicht muss größer als der des Trägermaterials und gegebenenfalls verwendeter Zwischenschichten sein. Bevorzugt besteht die planare, transparente, wellenleitende Schicht aus einem Material mit einem Brechungsindex größer als 2.

Geeignete Materialien sind anorganische Materialien, vorzugsweise anorganische Metalloxide wie TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , oder ZrO_2 .

Bevorzugt sind Ta_2O_5 und TiO_2 .

Die Dicke der transparenten, wellenleitenden Schicht beträgt bevorzugt 80 bis 160 nm.

Die Modulationstiefe des Gitters zur Einkopplung des Anregungslichts beträgt bevorzugt 5 bis 30 nm.

Bevorzugt weist das Gitter ein Steg zu Nut-Verhältnis von 0,5 - 2 auf. Unter Steg zu Nut -Verhältnis ist zum Beispiel bei einem Rechteckgitter das Verhältnis der Breite der Stege zu der Breite der Nuten zu verstehen.

Das Gitter zur Einkopplung des Anregungslichts ist als optisches Beugungsgitter ausgebildet, bevorzugt als Reliefgitter. Die Reliefstruktur kann dabei verschiedene Formen aufweisen. Geeignet sind zum Beispiel Sinus-, Rechteck- oder Sägezahnstrukturen. Verfahren zur Erzeugung solcher Gitter sind bekannt. Vorwiegend werden photolithographische oder holographische Verfahren und Ätztechniken für ihre Herstellung eingesetzt, wie sie beispielsweise in Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors V. Proc. SPIE, Vol 2068, 1-13, 1994 beschrieben sind.

Die Gitterstruktur kann auf dem Trägermaterial erzeugt und danach in die wellenleitende Schicht übertragen werden, in der sich dann die Gitterstruktur abbildet, oder das Gitter wird in der wellenleitenden Schicht selbst erzeugt.

Die Gitterperiode kann 200 bis 1000 nm betragen, wobei das Gitter vorteilhaft nur eine Periodizität aufweist, das heißt monodiffraktiv ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann die Probe sowohl stationär mit der wellenleitenden Schicht in Kontakt gebracht werden, als auch kontinuierlich über sie geleitet werden, wobei der Kreislauf offen oder geschlossen sein kann.

Eine spezifische Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass man die zum Nachweis des Analyten benutzten lumineszenzfähigen Stoffe direkt an der Oberfläche der wellenleitenden

Schicht (b) immobilisiert. Es kann sich dabei zum Beispiel um einen an ein Protein gebundenen Luminophor handeln, der auf diese Weise an der Oberfläche der wellenleitenden Schicht zur Lumineszenz angeregt werden kann. Wird ein für das Protein affiner Partner über diese immobilisierte Schicht geleitet, so kann dadurch die Lumineszenz verändert und auf diese Weise die Menge des affinen Partners bestimmt werden. Insbesondere können auch beide Partner eines Affinitätskomplexes mit Luminophoren markiert sein, um beispielsweise Konzentrationsbestimmungen anhand des Energietransfers zwischen den beiden, etwa in Form von Lumineszenzlöschung, vorzunehmen.

Eine weitere, bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens für chemische oder biochemische Affinitätsassays besteht darin, daß man auf der Oberfläche der Sensorplattform einen spezifischen Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für den Analyten selbst oder für einen der Bindungspartner immobilisiert. Dabei kann es sich um einen ein- oder mehrstufigen Assay handeln, in dessen Verlauf in aufeinanderfolgenden Schritten eine oder mehrere Lösungen mit spezifischen Bindungspartnern für die auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisierten Erkennungselemente geführt werden, wobei der Analyt in einem der Teilschritte gebunden wird. Der Nachweis des Analyten erfolgt dabei durch Bindung von lumineszenzfähig markierten Teilnehmern des Affinitätsassays. Bei den dabei eingesetzten lumineszenzmarkierten Stoffen kann es sich um einen oder mehrere beliebige Bindungspartner des Affinitätsassays handeln, oder auch um einen mit einem Luminophoren versehenen Analog des Analyten. Voraussetzung ist lediglich, dass die Anwesenheit des Analyten selektiv zu einem Lumineszenzsignal oder selektiv zu einer Änderung des Lumineszenzsignals führt.

29.05.02

-15-

Die Immobilisierung der Erkennungselemente kann zum Beispiel durch hydrophobe Adsorption oder kovalente Bindung direkt auf der wellenleitenden Schicht oder nach chemischer Modifikation der Oberfläche, z. B. durch Silanisierung oder Aufbringung einer Polymerenschicht, erfolgen. Zusätzlich kann zur Erleichterung der Immobilisierung der Erkennungselemente direkt auf dem Wellenleiter eine dünne Zwischenschicht als Haftvermittlungsschicht, z. B. bestehend aus SiO_2 , aufgebracht werden. Die Dicke dieser Zwischenschicht sollte 50 nm, vorzugsweise 20 nm, nicht übersteigen.

Geeignete Erkennungselemente sind typischerweise Antikörper für Antigene, Bindungsproteine wie Protein A und G für Immunglobuline, Rezeptoren für Liganden, Oligonukleotide und RNA- oder DNA-Einzelstränge für ihre Komplementärstränge, Avidin für Biotin, Enzyme für Enzymsubstrate, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektine für Kohlehydrate. Welcher der jeweiligen Affinitätspartner auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert wird, ist abhängig von der Architektur des Assays.

Der Assay selbst kann sowohl ein einstufiger Komplexierungsprozess, beispielsweise ein kompetitiver Assay, oder auch ein mehrstufiger Prozess, beispielsweise ein Sandwich-Assay, sein.

Im einfachsten Fall des kompetitiven Assays wird die Probe, welche den Analyten in unbekannter Konzentration sowie eine bekannte Menge einer bis auf eine Lumineszenzmarkierung gleichartigen Verbindung enthält, mit der Oberfläche der Sensorplattform in Kontakt gebracht, wo die lumineszenzmarkierten und unmarkierten Moleküle um die Bindungsstellen an ihren immobilisierten Erkennungselementen konkurrieren. Bei dieser Assaykonfiguration erhält man ein maximales Lumineszenzsignal, wenn die Probe keinen Analyten enthält. Mit steigender Konzentration der nachzu-

weisenden Substanz werden die zu beobachtenden Lumineszenzsignale niedriger.

In einem kompetitiven Immunoassay braucht nicht unbedingt der Antikörper, sondern es kann auch das Antigen auf der Oberfläche der Sensorplattform als Erkennungselement immobilisiert werden. Generell ist es beliebig, welcher der Partner in chemischen oder biochemischen Affinitätsassays immobilisiert wird. Dieses ist ein prinzipieller Vorteil von auf Lumineszenz basierenden Assays gegenüber Verfahren wie beispielsweise Oberflächenplasmonenresonanz oder Interferometrie, welche auf der Änderung adsorbierter Masse im evaneszenten Feld der wellenleitenden Schicht beruhen.

Weiterhin braucht im Falle kompetitiver Assays die Konkurrenz nicht beschränkt zu sein auf Bindungsstellen an der Oberfläche der Sensorplattform. Beispielsweise kann auch eine bekannte Menge eines Antigens an der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert werden, welches anschließend mit der Probe in Kontakt gebracht wird, die eine unbekannte, nachzuweisende Menge des gleichen Antigens als Analyten sowie lumineszenzmarkierte Antikörper enthält. In diesem Fall findet die Konkurrenz zwischen an der Oberfläche immobilisierten und in Lösung befindlichen Antigenen um Bindung der Antikörper statt.

Der einfachste Fall eines mehrstufigen Assays ist ein Sandwich-Immunoassay, bei dem ein primärer Antikörper auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert wird. Die Bindung des nachzuweisenden Antigens und des zur Ausführung des Nachweises benutzten, lumineszenzmarkierten sekundären Antikörpers an ein zweites Epitop des Antigens kann sowohl durch aufeinanderfolgende Kontaktierung mit der das Antigen enthaltenden Lösung und einer zweiten, den lumineszenzmarkierten Antikörper enthaltenden Lösung erfolgen, oder nach vorheriger Zusammenführung dieser bei-

den Lösungen, so dass abschließend der Teilkomplex, bestehend aus Antigen und lumineszenzmarkiertem Antikörper, gebunden wird.

Affinitätsassays können auch weitere zusätzliche Bindungsschritte enthalten. Beispielsweise kann im Falle von Sandwich-Immunoassays in einem ersten Schritt Protein A auf der Oberfläche der Sensorplattform immobilisiert werden, welches spezifisch Immunoglobuline an ihrem sogenannten F_c-Teil bindet, welche dann als primäre Antikörper in einem nachfolgenden Sandwichassay dienen, der wie beschrieben ausgeführt werden kann.

Es gibt eine Vielzahl weiterer Ausführungsformen von Affinitätsassays, beispielsweise unter Verwendung des bekannten Avidin-Biotin-Affinitätssystems.

Beispiele von Ausführungsformen von Affinitätsassays finden sich bei J. H. Rittenburg, Fundamentals of Immunoassay; in Development and Application of Immunoassay for Food Analysis, J. H. Rittenburg (Ed.), Elsevier, Essex 1990, oder in P. Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds), Elsevier, Amsterdam 1985.

Weiterhin ist es möglich, die Oberfläche der Sensorplattform sowohl für den Einmalgebrauch zu benutzen als auch sie zu regenerieren. Unter geeigneten Bedingungen, beispielsweise tiefem pH, erhöhter Temperatur, unter Anwendung organischer Lösungsmittel oder bei Einsatz sogenannter chaotroper Reagenzien (Salze), können die Affinitätskomplexe selektiv dissoziiert werden, ohne die Bindungsfähigkeit der immobilisierten Erkennungselemente wesentlich zu beeinträchtigen. Die genauen Bedingungen sind stark abhängig vom jeweiligen Affinitätssystem.

Eine weitere wesentliche Anwendungsform des Verfahrens beruht zum einen auf der Beschränkung der Signalerzeugung - im Fall der Rückkopplung gilt dies auch für die Signaldetektion - auf das evaneszente Feld des Wellenleiters, zum anderen auf der Reversibilität der Affinitätskomplexbildung als Gleichgewichtsprozess: Unter Anwendung geeigneter Flussraten in einem Durchflusssystem kann die Bindung oder Desorption bzw. Dissoziation gebundener, lumineszenzmarkierter Affinitätspartner im evaneszenten Feld in Echtzeit verfolgt werden. Daher eignet sich das Verfahren für kinetische Studien zur Bestimmung unterschiedlicher Assoziations- oder Dissoziationskonstanten oder auch für Verdrängungsassays.

Die Detektion der evaneszent angeregten Lumineszenz kann mit bekannten Methoden erfolgen. Geeignet sind Photodioden, Photozellen, Photomultiplier, CCD-Kameras und Detektor-Arrays, wie z. B. CCD-Zeilen. Die Lumineszenz kann mit optischen Elementen wie Spiegeln, Prismen, Linsen, Fresnellinsen und Gradientenindexlinsen auf diese abgebildet werden. Zur Selektion der Emissionswellenlänge können bekannte Elemente wie Filter, Prismen, Monochromatoren, dichroitische Spiegel und Beugungsgitter verwendet werden.

Eine Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass man die isotrop abgestrahlte, evaneszent angeregte Lumineszenz detektiert.

In einer anderen Ausführungsform des Verfahrens wird die in die Sensorplattform zurückgekoppelte, evaneszent angeregte Lumineszenz an den Kanten der Sensorplattform detektiert. Diese rückgekoppelte Fluoreszenzintensität ist überraschend hoch, so dass sich mit dieser Verfahrensweise ebenfalls eine sehr gute Empfindlichkeit erreichen lässt.

In einer weiteren Verfahrensform werden sowohl die evaneszent angeregte, isotrop abgestrahlte Lumineszenz als auch die in den Wellenleiter rückgekoppelte Lumineszenz unabhängig voneinander, aber simultan detektiert. Aufgrund der unterschiedlichen Selektivität der beiden Lumineszenzdetektionsmethoden, welche vom Abstand der Luminophoren von der wellenleitenden Schicht abhängig ist, können mit dieser Ausführungsform zusätzliche Informationen über die räumliche Verteilung der Luminophoren gewonnen werden. Damit ergibt sich auch eine Unterscheidungsmöglichkeit von photochemischem Ausbleichen der Luminophoren und Dissoziation der die Luminophoren tragenden Affinitätskomplexe.

Ein Vorteil des Verfahrens besteht auch darin, dass neben der Lumineszenzdetektion gleichzeitig auch die Absorption des eingestrahlten Anregungslichtes bestimmt werden kann. Gegenüber multimodalen Wellenleitern faseroptischer oder planarer Bauart wird in diesem Fall ein wesentlich besseres Signal/Rausch Verhältnis erreicht. Durch das gleichzeitige Messen von Lumineszenz und Absorption lassen sich mit hoher Empfindlichkeit Lumineszenzlöscheffekte feststellen.

Das Verfahren kann so durchgeführt werden, dass man das Anregungslicht ununterbrochen (CW-Betrieb, CW = "continuous wave") einstrahlt, dies bedeutet, dass mit zeitlich konstanter Lichtintensität angeregt wird.

Das Verfahren kann aber auch so durchgeführt werden, dass man das Anregungslicht in Form eines zeitlichen Pulses mit einer Pulsdauer von zum Beispiel einer Pikosekunde bis zu 100 Sekunden einstrahlt und die Lumineszenz zeitlich aufgelöst - im Falle kurzer Pulsdauern - oder in Intervallen von Sekunden bis zu Minuten detektiert. Diese Methode ist besonders dann vorteilhaft,

wenn man zum Beispiel die Geschwindigkeit einer Bindungsbildung analytisch verfolgen oder eine Lumineszenzsignalabnahme infolge photochemischen Ausbleichens verhindern will mittels kurzer Belichtungszeiten. Weiterhin ist bei Verwendung entsprechend kurzer Pulsdauer und geeigneter Zeitauflösung der Detektion die Diskriminierung von Streulicht, Ramanemission und kurzlebiger Lumineszenz möglicherweise vorhandener, unerwünschter lumineszierender Bestandteile der Probe und des Sensormaterials gegenüber einer in diesem Fall möglichst langlebigen Lumineszenz des Markierungsmoleküls möglich, indem die Emission des Analyten erst nach Abklingen dieser kurzlebigen Strahlung detektiert wird. Darüber hinaus erlaubt zeitaufgelöste Lumineszenzdetektion nach gepulster Anregung, ebenso wie modulierte Anregung und Detektion, die Untersuchung des Einflusses der Bindung des Analyten auf das molekulare Lumineszenzabklingverhalten. Die molekulare Lumineszenzabklingzeit kann, neben der spezifischen Analyterkennung durch die immobilisierten Erkennungselemente und der räumlichen Beschränkung der Signalerzeugung auf das evaneszente Feld des Wellenleiters, als ein weiteres Selektivitätskriterium benutzt werden.

Das Verfahren kann auch so durchgeführt werden, daß man, bei einer oder mehreren Frequenzen, das Anregungslicht intensitätsmoduliert einstrahlt und die resultierende Phasenverschiebung und Modulation der Probenlumineszenz detektiert.

Die Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Analyten in chemischen oder biochemischen Affinitätsassays mit bekannten Affinitätspartnern und Assayarchitekturen, mittels Detektion der Emission von lumineszenzfähig markierten Bindungspartnern oder mittels Detektion von Änderungen der Lumineszenz-

eigenschaften immobilisierter, lumineszenzmarkierter Affinitätspartner durch Wechselwirkung mit dem Analyten.

Da Signalerzeugung und -detektion auf die chemische oder biochemische Erkennungsoberfläche auf dem Wellenleiter beschränkt sind und Störsignale aus dem Medium diskriminiert werden, kann die Bindung von Substanzen an die immobilisierten Erkennungselemente in Echtzeit verfolgt werden. Die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Affinitäts screening oder für Verdrängungsassays, insbesondere für die pharmazeutische Produktentwicklung, mittels direkter Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsraten in einem Durchflusssystem mit geeigneten Flussraten, ist daher ebenfalls möglich.

Gemäß einem weiteren ihrer Aspekte bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung des Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern oder Antigenen.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Rezeptoren oder Liganden, Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymsubstraten, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlenhydraten ist ein weiteres Anwendungsgebiet der Erfindung.

Gemäß einem weiteren Aspekt bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur selektiven quantitativen Bestimmung lumineszierender Bestandteile in optisch trüben Flüssigkeiten.

Optisch trübe Flüssigkeiten können zum Beispiel biologische Flüssigkeiten wie Eigelb, Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma sein, aber auch Proben aus der Umweltanalytik wie beispielsweise Oberflächenwasser, gelöste Erdextrakte oder gelö-

ste Pflanzenextrakte. In Frage kommen auch Reaktionslösungen, wie sie beispielsweise bei der chemischen Produktion anfallen, insbesondere Farbstofflösungen oder Reaktionslösungen von optischen Aufhellern. In Frage kommen auch alle Arten von Dispersionen und Zubereitungen, wie sie zum Beispiel in der Textilindustrie eingesetzt werden, sofern diese eine oder mehrere lumineszierende Komponenten enthalten. Das Verfahren kann dadurch auch für die Qualitätssicherung eingesetzt werden.

Figur 1 zeigt schematisch im Querschnitt eine Vorrichtungsanordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Figur 2 zeigt daraus eine schematische Ausschnittvergrößerung des optischen Wellenleiters.

Diese Ausführungsformen der Erfindung sind im Detail:

Anregungsoptik und Wellenleiter:

- 1 anregender Laserstrahl,
- 1a geführter Mode,
- 2 Kopplungswinkel,
- 3 Gitter (4-5 nm Tiefe, 750 nm Periode, Rechteckform),
- 4 Optische Sensorplattform, bestehend aus 4a und 4b,
- 4a wellenleitende Schicht (Ta_2O_5 , $n = 2,317$ bei 488 nm),
- 4b Trägermaterial (Corning Glas, $n = 1,538$ bei 488 nm),

Detektionsoptik für die isotrop abgestrahlte Lumineszenz:

- 5 Sammellinse geeigneter Brennweite,
- 6 Interferenzfilter geeignet für das Maximum der Lumineszenz mit einer Halbwertsbreite von zum Beispiel 30 nm,
- 7 Sammellinse geeigneter Brennweite,
- 8 Detektor (Photodiode),

Detektionsoptik für die in die Sensorplattform zurückgekoppelte Lumineszenz:

- 9 Glasfaserbündel mit rechteckigem Querschnitt,
- 10 Interferenzfilter geeignet für das Maximum der Lumineszenz mit einer Halbwertsbreite von zum Beispiel 30 nm,
- 11 Photodiode,

Detektion des transmittierten Lichts:

- 12 Glasfaserbündel mit rechteckigem Querschnitt,
- 13 Interferenzfilter geeignet für das Maximum der Lumineszenz mit einer Halbwertsbreite von zum Beispiel 30 nm,
- 14 Photodiode

Probenzelle (drehbar):

- 15 Oberteil, welches -angepresst auf die Sensorplattform- mit dieser zusammen die Durchflusszelle bildet,
- 16 abdichtender O-Ring
- 17 Flüssigkeitszuführung
- 18 Flüssigkeitsabführung
- 19 Zuführung für Thermostatregelung,
- 20 Abführung für Thermostatregelung.

Die einzelnen für den Aufbau verwendeten Elemente sind bekannt und im Handel erhältlich.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Die Konzentrationsangabe M bedeutet in allen nachfolgenden Beispielen mol/l.

Beispiel 1

1.1 Optischer Aufbau

Das Anregungslicht eines Argon-Ionen-Lasers (Anregungswellenlänge 488 nm) wird mit Hilfe eines drehbaren Spiegels von der Rückseite des Trägermaterials her auf das Gitter der wellenleitenden Schicht gerichtet. Auf der Oberseite der wellenleitenden Schicht wird, gedichtet durch O-Ringe, von oben eine thermostatisch geregelte Durchflusszelle angedrückt, deren Volumen ca. 0.07 ml beträgt. Die im evaneszenten Feld angeregte Lumineszenz der Probe und die Transmission des Anregungslichts werden mittels 3 räumlich verschieden angeordneter Detektoren simultan aufgezeichnet. Die Anordnung ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Detektor 8 besteht aus einer Photodiode (UDT UV-50, United Detector Technology, Hawthorne, CA, USA), auf die über Interferenzfilter und Kondensorlinse die isotrop abgestrahlte Lumineszenz fokussiert wird. Detektor 14 besteht aus einer Photodiode (SR 1133, Hamamatsu), auf die mittels einer Glasfaseroptik unter Filterung mit einem Interferenzfilter die in die wellenleitende Schicht rückgekoppelte Lumineszenz, beobachtet unter 90° zur Ausbreitungsrichtung des fortschreitenden Modes, geleitet wird. Das Signal wird mittels eines Transimpedanzverstärkers verstärkt. Das Transmissionslicht wird in analoger Weise durch Detektor 11 in Ausbreitungsrichtung des Modes unter Filterung mit einem Interferenzfilter auf eine Photodiode (UDT UV-50, United Detector Technology, Hawthorne, CA, USA) geleitet und verstärkt.

1.2 Charakterisierung der Sensormaterialien und des Einkoppelergebnisses

1.2.1 Optische Sensorplattform

Geometrie: 16mm x 48mm x 0.5mm.

Wellenleitende Schicht: Ta_2O_5 , $n = 2,317$ bei 488 nm, Dicke 100 ± 5 nm.

Trägermaterial: Corning Glas C7059, $n = 1,538$ bei 488 nm.

Gitter: Rechteckgitter mit einer Modulationstiefe von 4-5 nm,
Gitterperiode 750 nm.

1.2.2 Einkoppelergebnis bei Anregung mit 633 nm

Koppelwinkel: 4° - 5° (zweite Beugungsordnung)

Einkopplungseffizienz: 7% am Gitterort

Dämpfung: 2,5dB/cm.

1.3. Detektion von fluoresceinmarkiertem Immunoglobulin an immobilisiertem Protein A

Probenlösung:

1×10^{-8} M fluoresceinmarkiertes Immunoglobulin (Sigma Chemicals, F-IgG);

0,5 l Phosphatpuffer, bestehend aus 0,041 M Na_2HPO_4 und 0,028 M KH_2PO_4 ;

1 ml POE-(20)-Sorbitolmonolaurat (Tween 20, ICI);

200 mg Natriumazid, 50ml Methanol, auf 1 Liter aufgefüllt mit destilliertem Wasser.

Der Sensor wird 10 Stunden in einer wässrigen Lösung von Protein A (Sigma Chemicals, 1mg/ml) inkubiert. Um eventuell noch freie Adsorptionsstellen abzusättigen, wird der Sensor nach Waschen mit destilliertem Wasser nochmals eine Stunde in einer Phosphatpufferlösung, die 10g/l Rinderserum Albumin (Sigma Chemicals) enthält, inkubiert.

Die Probenlösung wird 9 Minuten lang über die mit Protein A belegte Sensoroberfläche im Durchfluss geführt.

Die isotrop abgestrahlte, die evaneszent rückgekoppelte Fluoreszenz und die Transmission werden während dieser 9 Minuten entsprechend der Beschreibung unter 1.1 gemessen. Man erhält eine Empfindlichkeit von ca. 1×10^{-10} M, bezogen auf F-IgG.

In allen nachfolgend aufgeführten Applikationsbeispielen wird die in Beispiel 1 beschriebene Sensorplattform und der dort beschriebene optische Aufbau verwendet.

Beispiel 2

Detektion von fluoresceinmarkiertem Immunoglobulin an immobilisiertem Protein A:

Verwendete Lösungen:

- 1) Pufferlösung : bestehend aus 0.5 l Phosphatpuffer (0.041 M Na_2HPO_4 + 0.028 M KH_2PO_4), 0.151 M NaCl, 250 mg/l Natriumazid, 50 ml Methanol, 1 g/l Rinderserumalbumin (BSA); 0.5 ml POE-(20)-Sorbitolmonolaurat (Tween 20, ICI), mit destilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt.
- 2) Lösung zur Immobilisierung von Protein A (Sigma Chemicals): 1 mg / ml dest. Wasser
- 3) Absättigungslösung: Pufferlösung 1) + 10 mg / ml Rinderserumalbumin (BSA, Sigma Chemicals)
- 4) Spüllösung: Pufferlösung 1)
- 5) Probenlösungen: fluoresceinmarkiertes Immunoglobulin 10^{-8} M in Pufferlösung 1.
- 6) Regenerierungslösung: Glycinpuffer, pH 2

Verfahren:

Die optische Sensorplattform wird 10 Stunden lang mit der Lösung 2) zur Immobilisierung von Protein A inkubiert. Um eventuell noch freie Adsorptionsstellen abzusättigen, wird die Sensorplattform nach Waschen mit destilliertem Wasser nochmals eine Stunde in der Absättigungslösung mit 10 mg / ml BSA inkubiert.

Das Verfahren besteht aus folgenden Einzelschritten, die in einer Durchflusszelle (Flussrate 1 ml / min) durchgeführt werden: 5 Minuten Waschen mit Pufferlösung 1), danach Aufnahme des Untergrund-Signals;

29.05.02

- 27 -

9 Minuten Zufuhr der Probenlösung 5);
5 Minuten Waschen mit Pufferlösung 1);
5 Minuten Zufuhr der Regenerierungslösung 6);
5 Minuten Waschen mit Pufferlösung 1).

Die isotrop abgestrahlte und die in die Sensorplattform rückgekoppelte Fluoreszenz sowie die Transmission werden während des ganzen Verfahrens entsprechend Beispiel 1 gemessen.

Neben einem starken Signal der isotrop abgestrahlten Fluoreszenz werden auch starke Signale der rückgekoppelten Fluoreszenz sowie eine deutlich verringerte Transmission in Gegenwart des Analyten gemessen. Die Fluoreszenzsignale steigen während der Zufuhr des fluoreszierenden Analyten an und zeigen den typischen Verlauf einer Adsorptionskurve. Das Signal für die rückgekoppelte Fluoreszenz ist bei gleicher Verstärkung nur um einen Faktor 2 niedriger als das Signal der isotrop emittierten Fluoreszenz. Das Transmissionssignal zeigt einen Verlauf, der nahezu spiegelbildlich zu den Fluoreszenzsignalen ist. Bis zum Erreichen des Maximums der Fluoreszenz nimmt das Transmissionssignal um 25 % ab. Im selben Maße, wie die Fluoreszenz nach dem Regenerierungsschritt zurückgeht, nimmt das Transmissionssignal wieder zu.

Beispiel 3

Detektion von fluoresceinmarkiertem Immunglobulin an immobilisiertem Protein A:

Verwendete Lösungen:

- 1) Pufferlösung, bestehend aus 1/3 Phosphatpuffer (0.041 M Na_2HPO_4 + 0.028 M KH_2PO_4), 0.151 M NaCl, 200 mg/l Natriumazid, 50 ml Methanol, aufgefüllt auf 1 l mit destilliertem Wasser;
- 2) Lösung zur Immobilisierung von Protein A (Sigma Chemicals): 1 mg/ml Pufferlösung 1);

29.05.02

-28-

- 3) Absättigungslösung: Pufferlösung 1) + 10 mg / ml Rinderserumalbumin (BSA, Sigma Chemicals);
- 4) Spüllösung, wird auch verwendet zur Bestimmung des Signaluntergrunds Pufferlösung 1) + 1 mg / ml BSA;
- 5) Probenlösungen: fluoresceinmarkiertes Immunglobulin in verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M) in Pufferlösung 1) mit 1 mg / ml BSA;
- 6) Regenerierungslösung: Glycinpuffer, pH 2.5;

Verfahren:

Die optische Sensorplattform wird 2 Stunden lang mit der Lösung zur Immobilisierung von Protein A inkubiert. Um eventuell noch freie Adsorptionsstellen abzusättigen, wird die Sensorplattform nach Waschen mit destilliertem Wasser nochmals eine Stunde in der Absättigungslösung mit 10 mg / ml BSA inkubiert.

Das Verfahren besteht aus folgenden Einzelschritten:

- 2 Minuten Waschen mit Spüllösung 4) (0.1 ml / min), Aufzeichnung des Untergrund-Signals;
- gleichzeitiges Einsaugen der Probe (1 ml) in eine Schlauch-Schleife (Loop) über einen automatischen Probengeber;
- anschließend wird die Probe durch Ausstoßen des Loops ca. 7 Minuten lang über die Sensorplattform geführt (0.1 ml / min, zwischen Anfangs- und End-Puls);
- danach folgt ein Spülschritt mit Lösung 4);
- nach Applikation der Regenerierungslösung wird wiederum mit Lösung 4) gespült.

Die isotrop abgestrahlte Fluoreszenz und die Transmission werden während des gesamten Verfahrens entsprechend Beispiel 1 gemessen.

29.05.02

-29-

Bei einer Konzentration von 10^{-10} M fluoresceinmarkierten Immunglobulins wird noch ein deutliches Fluoreszenzsignal beobachtet; Änderungen der Transmission werden bis zu Konzentrationen von 10^{-8} M bestimmt.

Nach Glätten der Daten (9-Punkte-Durchschnitte) kann eine Analytkonzentration von 10^{-11} M noch festgestellt werden.

Bei den verschiedenen Konzentrationen ergeben sich folgende Signaländerungen am Ende der Probenzufuhr, verglichen mit dem anfänglichen Hintergrund-Signal (Signal/Rausch Verhältnis zwischen 1 und 4 mV):

[F-IgG]	Fluoreszenzsignal (V)	Änderung des Transmissionssignals
10^{-8} M	1.0	- 10 %
10^{-9} M	0.2	nicht bestimmt
10^{-10} M	0.039	nicht bestimmt
10^{-11} M	0.008	nicht bestimmt

(nach Glättung)

Die Nachweisgrenze liegt unter 10^{-11} M, was einer Analytmenge von 10^{-14} Mol fluoresceinmarkiertem IgG entspricht.

Beispiel 4

1.4. Detektion von fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden mit immobilisierten Komplementärsträngen in einem Hybridisierungssay

Verwendete Lösungen:

29.05.02

-30-

- 1) Hybridisierungspuffer (pH 7.75), bestehend aus 0.069 M Phosphatpuffer (0.041 M Na_2HPO_4 + 0.028 M NaH_2PO_4), 0.176 M KCL, 1 ml POE-(20)- Sorbitolmonolaurat (Tween 20, ICI), 1 g Polyacrylsäure PAA 5100, 500 mg / l Natriumazid, aufgefüllt auf 1 l mit destilliertem Wasser
- 2) Probenlösungen: fluoresceinmarkiertes, zu dem auf der Sensorplattform immobilisierten Oligomeren komplementäres, aus 16 Basenpaaren bestehendes Oligomer (Fluorescein-5'-GTTGTGTGGAATTGTG-3' (10^{-12} M/l) in Hybridisierungspuffer 1)
- 3) Regenerierungslösung: 50% (G/G) Harnstoff in wässriger Lösung

Verfahren:

Mit einem Oligonukleotid-Synthesizer (Applied Biosystems 394B) wird der Erkennungsstrang (capture probe) 3'CAACACACCTTAACAC-5' direkt auf einer mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan silanierten Sensorplattform synthetisiert nach einem Verfahren, wie es standardmäßig bei der Oligonukleotidsynthese auf Partikeln verwendet wird (zum Beispiel in M. J. Gait Oligonucleotide Synthesis. A practical approach. Oxford University Press, NY 1990). Abweichend zum Standardsynthese-Verfahren wird für die Verankerung auf der Oberfläche, am 3'-Ende, jedoch 4-(4,4'-Dimethoxytrityl)-Hydroxybuttersäure als stabile Brückengruppe verwendet, um eine spätere Abspaltung von der Sensoroberfläche zu verhindern. Nach Waschen mit Wasser wird die Sensorplattformen mit den immobilisierten Erkennungssträngen im Nachweisverfahren verwendet.

Das Verfahren besteht aus folgenden Einzelschritten:

- 8 Minuten Waschen mit Hybridisierungspuffer 1) (0.5 ml / min), Aufnahme des Untergrund-Signals;
- 26 Minuten (nach einem 5 sec Flush von 5 ml/min) Zuführung der Probenlösung 2) (0.05 ml / min);

29.05.02

- 31 -

- 4 Minuten Spülen mit Hybridisierungspuffer 1) (0.5 ml /min);
- 4 Minuten Zufuhr der Regenerierungslösung 3) (0.5 ml /min);
- 4 Minuten Spülen mit Hybridisierungspuffer 1) (0.5 ml /min);

Die isotrop abgestrahlte Fluoreszenz und die Transmission werden während des Verfahrens entsprechend Beispiel 1 gemessen. Nach 10 minütiger Probenzufuhr, was einer Menge von 500 Attomol fluoresceinmarkierter Nachweis-DNA (tracer-DNA) entspricht, wurde ein Fluoreszenzsignal von 20 mV beobachtet, bei einem Signalrauschen von etwa 1 mV.

95 922 453.6

EP 0 760 944 B1

ANSPRÜCHE

1. Planere, dielektrische, optische Sensorplattform, bestehend aus einem transparenten Träger (a), auf dem eine dünne, transparente, wellenleitende Schicht (b) aus einem anorganischen Material aufgebracht ist und der mit einem Gitter für die Einkopplung des Anregungslichts versehen ist, wobei der Brechungsindex des Trägers (a) geringer als der Brechungsindex der wellenleitenden Schicht (b) ist, dadurch gekennzeichnet, dass
 - (A) das Gitter eine Modulationstiefe von 3 bis 60 nm aufweist,
 - (B) die Dicke der Schicht (b) 40 bis 160 nm beträgt, und
 - (C) das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der Schicht (b) kleiner als 0,5 ist.
2. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der der Träger aus Quarz, einem anorganischen Glas oder einem Kunststoffmaterial besteht.
3. Sensorplattform nach Anspruch 2, bei der der Träger aus einem anorganischen Glas besteht.
4. Sensorplattform nach Anspruch 2, bei der das Kunststoffmaterial aus Polycarbonat oder Polymethylmethacrylat besteht.
5. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der zwischen Träger (a) und wellenleitender Schicht (b) eine Zwischenschicht aus SiO_2 , einem thermoplastischen, thermisch vernetzbaren oder strukturvernetzten organischen Kunststoffmaterial aufgebracht ist, deren Brechungsindex kleiner oder gleich dem des Trägers (a) ist.

29.05.02

- 33 -

6. Sensorplattform nach Anspruch 5, bei der die Dicke der Zwischenschicht gleich oder weniger als $10\text{ }\mu\text{m}$ beträgt.
7. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der die planare, transparente, wellenleitende Schicht (b) aus einem Material besteht, dessen Brechungsindex größer als 2 ist.
8. Sensorplattform nach Anspruch 7, bei der die planare, transparente, wellenleitende Schicht aus Ta_2O_5 oder TiO_2 besteht.
9. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der die planare, transparente, wellenleitende Schicht (b) eine Dicke von 80 nm bis 160 nm aufweist.
10. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der das Gitter zur Einkopplung des Anregungslichts ein optisches Beugungsgitter ist.
11. Sensorplattform nach Anspruch 10, bei der das optische Beugungsgitter ein Reliefgitter ist.
12. Sensorplattform nach Anspruch 10, bei der das Gitter die Form einer Sinus-, Sägezahn- oder Rechteckkurve besitzt.
13. Sensorplattform nach Anspruch 10, bei der das Gitter eine Gitterperiode von 200 bis 1000 nm aufweist.
14. Sensorplattform nach Anspruch 10, bei der das Gitter eine Modulationstiefe von 5 bis 30 nm besitzt.
15. Sensorplattform nach Anspruch 10, bei der das Gitter ein Steg zu Nut-Verhältnis von 0,5 - 2 aufweist.

16. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der sich eine Haftvermittlungsschicht auf der Oberfläche der wellenleitenden Schicht befindet.

17. Sensorplattform nach Anspruch 16, bei der die Haftvermittlungsschicht eine Dicke von gleich oder weniger als 50 nm hat.

18. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der die zum Nachweis des Analyten benutzten lumineszenzfähigen Stoffe direkt auf der Oberfläche der wellenleitenden Schicht (b) immobilisiert sind.

19. Sensorplattform nach Anspruch 1, bei der auf der Oberfläche der Sensorplattform spezifische Bindungspartner als chemisches oder biochemisches Erkennungselement für den Analyten selbst oder für einen der Bindungspartner in dem mehrstufigen Assay, immobilisiert sind.

20. Sensorplattform nach Anspruch 19, bei der die Sensorplattform regenerierbar ist und mehrmals verwendet werden kann.

21. Vorrichtung für den Nachweis von Lumineszenz, enthaltend eine Sensorplattform nach den Ansprüchen 1 - 20; erfährt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die isotrop abgestrahlte, evaneszent angeregte Lumineszenz detektiert.

22. Verfahren zum Detektieren einer Lumineszenz mit einer planaren, dielektrischen optischen Sensorplattform nach Anspruch 1, indem eine flüssige Probe mit der Schicht (b) in Kontakt gebracht wird, und die von lumineszenzfähigen Stoffen in der Probe oder von auf der Schicht (b) immobilisierten lumineszenzfähigen Stoffen erzeugte Lumineszenz optoelektronisch gemessen wird, wobei

29.05.02

- 35 -

das Anregungslicht von einem Laser durch das Gitter in die planare Wellenleitung eingekoppelt wird und die wellenleitende Schicht durchläuft, wodurch die lumineszenzfähigen Stoffe, die Lumineszenzeigenschaften aufweisen, im evaneszenten Feld der wellenleitenden Schicht zur Lumineszenz angeregt werden, und Detektieren der isotrop emittierten, evanszent angeregten Lumineszenz oder Detektieren der evanescent angeregten Lumineszenz, die an den Rändern der Sensorplattform in die Sensorplattform zurück eingekoppelt wird.

23. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem im wesentlichen paralleles Licht zum Anregen der Lumineszenz verwendet wird.

24. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem Laserlicht einer Wellenlänge zwischen 300 und 1100 nm für die Anregung der Lumineszenz verwendet wird.

25. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem Laserlicht einer Wellenlänge zwischen 450 und 850 nm für die Anregung der Lumineszenz verwendet wird.

26. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem Laserlicht einer Wellenlänge zwischen 480 und 700 nm für die Anregung der Lumineszenz verwendet wird

27. Verfahren nach Anspruch 22, enthaltend das Immobilisieren eines spezeillen Bindungspartners als chemische oder biochemische Nachweissubstanz für den Analyten selbst oder für einer der Bindungspartner auf der Oberfläche der sensorplattform in einem Mehrstufen-Assay, im Verlaufe dessen der Analyt in einer der Teilstufen gebunden wird.

29.05.02

- 36 -

28. Verfahren nach Anspruch 22, enthaltend die voneinander unabhängige aber gleichzeitige Erfassung der isotropisch emittierten Lumineszenz sowie des evaneszent angeregten Lichts, das zurück eingekoppelt wird.

29. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem die Absorption des Anregungslichts, das in die Wellenleitung eingekoppelt wird, gleichzeitig bestimmt wird.

30. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem das Anregungslicht in die Wellenleitung ununterbrochen eingekoppelt wird.

31. Verfahren nach Anspruch 22, enthaltend das Einkoppeln des Anregungslichts in Form eines zeitbestimmten Impulses und das Erfassen der zeitlich aufgelösten Lumineszenz.

32. Verfahren nach Anspruch 31, bei dem die Impulslänge auf 1 ps bis 100 s eingestellt ist.

33. Verfahren nach Anspruch 22, enthaltend das Einkoppeln des Anregungslichts einer mit einer oder mehreren Frequenzen modulierten Intensität und das Erfassen der resultierenden Phasenverschiebung and der Modulation der Probenlumineszenz.

34. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem die zu detektierende Probe Eigelb, Blut, Serum, Plasma oder Urin ist.

35. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem die zu detektierende Probe ein Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextract, eine Bioprozessbrühe oder Synthesebrühe ist.

36. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem biochemische Substanzen bei der Affinitätssensorik quantitativ bestimmt werden.

29.05.02

- 37 -

37. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem Antikörper oder Antigene quantitativ bestimmt werden.

38. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem Rezeptoren oder Liganden, Oligonukleotide, DNA- oder RNA-Stränge, DNA- oder RNA-Analoga, Enzyme, Enzymsubstrate, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektine und Kohlehydrate quantitativ bestimmt werden.

39. Verfahren nach Anspruch 22, bei dem lumineszirende Bestandteile in optisch trüben Flüssigkeiten quantitativ bestimmt werden.

29.05.02

EP 0 760 944 B1

1/2

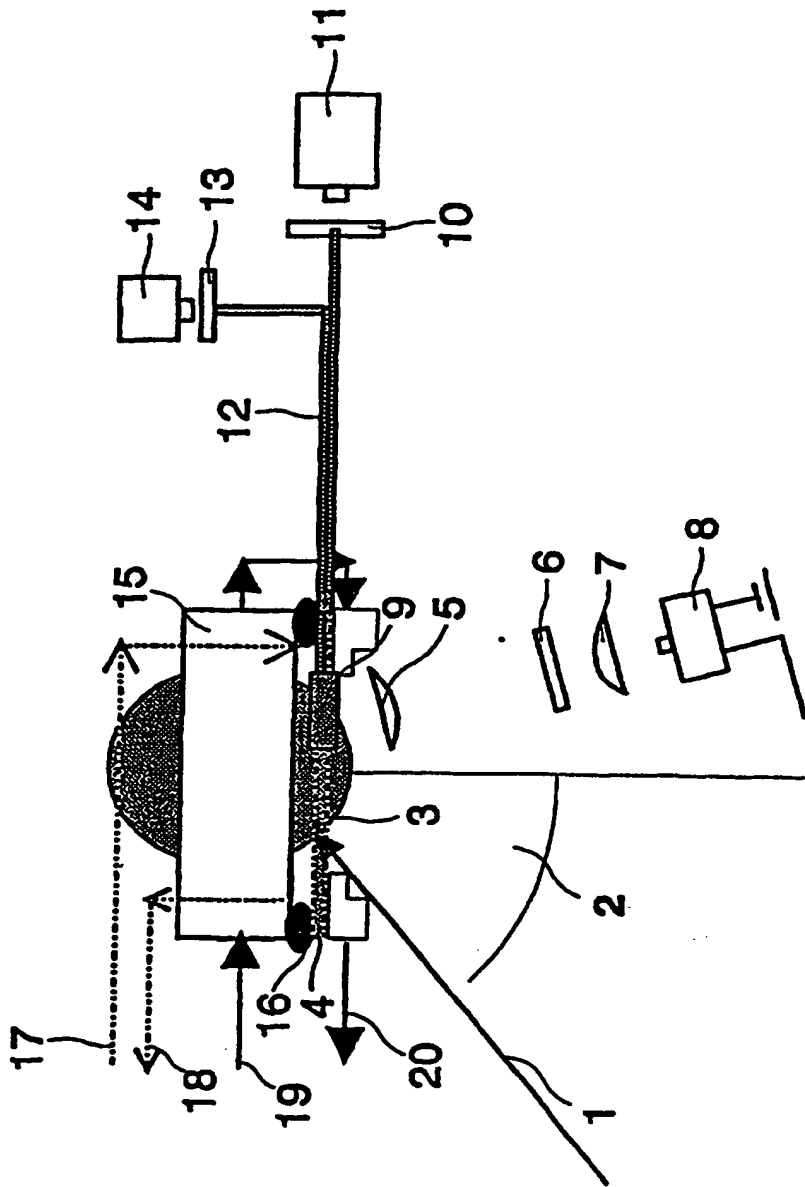


Fig. 1

29.05.02

2/2

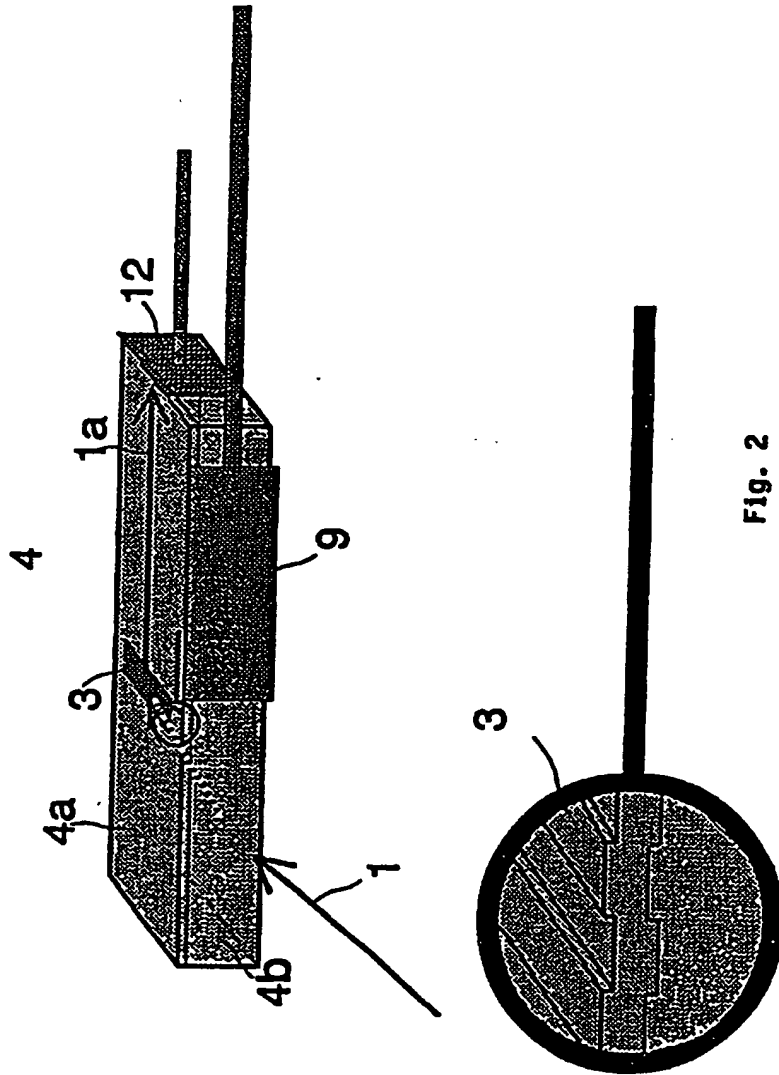


Fig. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.